

김치 종류에 따른 유산균의 생물학적 및 기능적 특성

고강희 · 유문려 · 이현희 · 은 걸 · 김인철*

목포대학교 식품공학과

Biological and Functional Characteristics of Lactic Acid Bacteria in Different Kimchi

Kang Hee Ko, Wenli Liu, Hyun Hee Lee, Jie Yin, and In Cheol Kim[†]

Dept. of Food Engineering, Mokpo National University, Jeonnam 534-729, Korea

Abstract

Biological and functional characteristics of lactic acid bacteria (LAB) were investigated in mustard stem/leaf kimchi (MK), cabbage kimchi (CK), young radish kimchi (YRK), and cubed radish kimchi (CRK). LAB of young radish kimchi were mainly composed of bacilli in contrast to the other kimchi. 89.2% LAB isolated from all kimchi harbored plasmids. However, LAB had an average of 4.1 ± 0.5 plasmid bands in YRK, more than MK, CK, and CRK. Exopolysaccharides were produced by 10.9~11.1% of LAB, and were especially by LAB isolated from radish kimchi. A significant percentage of LAB (69.5%) had antibacterial activity against one sensitive strain or more. LAB from CK, YRK and CRK had antimicrobial activities against *Bacillus* sp., *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella* Typhimurium, while the LAB from MK had activities against *Vibrio parahaemolyticus* higher than those from the other kimchi. In YRK and CRK, acid-tolerant LAB were twice as prevalent as those in MK and CK. Bile-tolerant LAB isolated from CRK were more prevalent than other kimchi. When 10^8 CFU of LAB were added to Caco-2 cells, 12.1% of LAB isolated from all kimchi showed similar adherent activity to *Lactobacillus rhamnosus* GG. LAB of MK particularly adhered to Caco-2 cells, 2.0~4.1 fold higher than LAB in the other kimchi. From these results, biological and functional characteristics of LAB varied according to the type of kimchi and LAB existing in kimchi were limited to their respective species.

Key words: kimchi lactic acid bacteria, exopolysaccharide, antibacterial activity, acid and bile tolerance, adherence to Caco-2

서 론

유산균은 발효식품의 주된 미생물로 특히 오랫동안 발효 유제품의 스타터로 이용되어 왔다. 유산균은 정장 작용, 면역 조절, 항암 및 항돌연변이 효과, 콜레스테롤 저하, 항알레르기 효과, 유당불내증 완화 등의 프로바이오틱 기능성이 알려지면서 산업적 이용분야가 식품에서 의약, 화장품 및 사료 분야까지 확대되었다(1). 이러한 유산균을 획득할 수 있는 한국의 대표적인 전통 발효식품으로 장류, 젓갈, 김치 등을 들 수 있다.

김치는 배추, 무, 오이, 열무, 파 등과 같은 채소류를 소금에 절인 후, 고추, 양파, 마늘 등의 다양한 부재료를 첨가하여 발효숙성시킨 산 발효식품으로(2), 열처리를 하지 않은 상태의 재료들을 이용해 원재료들이 지니고 있는 생리활성과 발효 미생물인 유산균의 프로바이오틱 기능을 동시에 지니고 있는 것이 특징인 한국의 전통 발효식품이다(3). 주재료별 김치 및 절임류 분류에 따르면 한국에는 151종이 존재하며, 배추 25종, 무 62종, 기타 채소 64종, 해조류 5종, 동물

성 재료 21종이다. 이 중 가장 많이 이용하는 주재료가 배추와 무 등의 식물성 원료이다(4).

김치 종류는 다양하지만 분포되어 있는 유산균은 김치 종류와 상관없이 *Lactobacillus* 속, 유제품 및 장관에서 분리빈도가 낮은 *Leuconostoc* 속이 우점종으로 존재한다. 그 외 *Weissella* 속, *Pediococcus* 속 등이 있지만, 김치 제조방법이나 장소 등 주변 환경에 따라 이들은 나타나지 않을 수도 있다(5-7). 현재까지 알려진 김치의 유익한 효과는 식욕 촉진, 비만 예방, 변비 및 대장암 예방, 콜레스테롤 감소, 항산화효과, 항암효과 및 면역증강 효과, 고지혈증 억제 등으로 김치의 주 발효원인 유산균의 기능성과 유사하다(8).

김치는 제조 환경, 원료, 제조자 등에 따라 맛, 조직감 등의 특성이 다양해지지만 발효에 관여하는 유산균은 매우 한정적이어서 김치 종류에 따른 유산균의 생리적 특성 차이가 있을 것으로 추정된다. 그러나 대부분의 연구 결과가 배추김치를 위주로 유산균의 분포도 및 기능성에 대해 확인하였으므로 김치의 종류에 따른 유산균의 생리적 활성에 대한 연구 보고가 없다. 그러므로 본 연구에서는 한국에서 가장 많이

[†]Corresponding author. E-mail: ickim@mokpo.ac.kr
Phone: 82-61-450-2426, Fax: 82-61-454-7916

소비되고 장시간 숙성시켜도 맛을 유지하는 배추를 주재료로 하는 배추김치, 무를 주재료로 하는 깍두기와 열무김치, 기타 채소 중 갓김치로부터 유산균을 분리하여 각 김치 종류에 따른 유산균의 생물학적 및 기능적 특성을 확인하였다.

재료 및 방법

김치 수집과 유산균 분리

전남, 경기·서울 지방, 제주, 경상도의 갓김치(이하 MK로 명명) 124종, 배추김치(이하 CK) 99종, 열무김치(이하 YRK) 62종, 깍두기(이하 CRK) 33종의 김치를 수집하였다. 완숙기에 접어든 먹기 좋은 상태의 김치 10 g을 90 mL 멸균수와 함께 혼합, 마쇄하였다. 마쇄액을 10배 단계 희석한 다음, 0.5% CaCO₃(w/v)가 들어간 MRS(Mon de Rogosa Sharpe, Criterion, Santa Maria, CA, USA) 고체 배지에 분주하였다. 30°C에서 2일 동안 배양하여 CaCO₃에 대하여 투명한 형성을 콜로니를 분리하였다. 분리된 균주는 MRS 액체 배지에 배양한 후, 25% glycerol(v/v) stock을 만들어 -70°C에 보관하였다.

유산균의 생물학적 분석

분리된 유산균은 catalase 시험, Gram 염색 및 광학현미경(Olympus, Tokyo, Japan)을 통한 형태학적 관찰을 하였다. 이들 중 *Leuconostoc* 속과 *Lactobacillus* 속을 1차 선별하기 위해 각각 PES(phenyl ethyl alcohol-sucrose agar)배지와 LBS(*Lactobacillus* selection)배지를 사용하였다. 유산균을 MRS배지에 0.1% 접종하여 30°C에서 24시간 배양한 다음, PES 고체배지(peptone 5.7 g, yeast extract 0.5 g, sucrose 20 g, ammonium sulfate 2 g, dipotassium phosphate 1 g, magnesium sulfate 0.244 g, phenylethyl alcohol 1.5 mL, agar 15 g/L)에 도말한 후, 20°C에서 3~5일간 배양하고 균주의 성장 유무 및 점질물 형성을 관찰하여 *Leuconostoc* 속을 선별하였다(9). *Lactobacillus* 속의 유산균을 선별하기 위해 LBS배지(Rogosa SL agar 74.5 g, sodium acetate 30 g/L, pH 5.5)에 도말하여 30°C에서 3일 동안 배양한 후, 균주의 생육을 확인하였다(10).

각 유산균의 plasmid는 mini-prep kit(Qiagen, Düsseldorf, Germany)을 사용하여 분리하였고 1.0% agarose gel에 전기영동 하였다. Size marker로는 λ DNA(*Hind*III cut)(Koschem, Seongnam, Korea)와 1 kb DNA ladder(Takara, Otsu, Japan)를 사용하였다.

Exopolysaccharide(EPS) 분리

MRS 액체배지에 전배양한 유산균을 2% sucrose가 들어 있는 MRS 액체배지에 0.1% 접종하여 30°C에서 24시간 배양하였다. 배양액을 12,000×g에서 1분 동안 원심분리 하여 균체를 제거하고 상정액을 회수하였다. 상정액 1 부피에 대하여 95% 에탄올을 동일한 부피만큼 넣고 4°C에서 24시간

동안 정지시켰다. 이를 1,100×g에서 5분 동안 원심분리 하여 침전물을 회수하고 60°C에서 12시간 동안 건조시킨 다음, 이의 건조중량(w/v)을 측정하였다(11).

유산균의 항균력 측정

유산균의 항균활성은 spot on lawn assay 방법으로 측정하였다(12). 이에 감수성 균주는 *Bacillus cereus* ATCC27348 (LB, Luria-bertani, Difco, Lawrence, KS, USA), *Bacillus subtilis* ATCC6633(BHI, brain heart infusion, Difco), *Salmonella* Typhimurium KCTC2515(LB), *Micrococcus luteus* ATCC13513(LB), *Lactobacillus plantarum* ATCC8014 (MRS), *Listeria monocytogenes* ATCC19113(BHI), *Vibrio parahaemolyticus* ATCC27969(TSA, tryptic soy agar + 2.5% NaCl, Difco), *Escherichia coli* ATCC25922(LB)로 총 8종을 사용하였고 *L. plantarum* ATCC 8014만 30°C에서 24시간 배양하고 나머지는 모두 37°C에서 16~18시간 동안 배양하였다. 30°C에서 24시간 동안 배양된 유산균 배양액을 11,600×g에서 5분 동안 원심분리 하여 상정액과 균체를 분리하였다. 균체는 멸균수로 2번 세척하고 OD₆₀₀=1.0으로 조절한 후, 5 μ L를 MRS 고체배지에 점적하였다. 각 감수성 균주의 생육배지에 대한 0.5% agar를 만들고 이에 감수성 균주(OD₆₀₀=1.0)를 1% 접종하여 유산균이 점적된 고체배지 위에 5 mL를 분주하고 균을 때까지 실온에서 방치하였다. 처리가 다 된 배지는 30°C에서 1일 동안 배양하여 점적 주변으로 형성된 투명한 폭을 측정하였다. 점적 주변으로 3~6 mm, 6~10 mm, 10 mm 이상의 투명한 범위는 각각 +, ++, +++로 나타내었다.

유산균의 내산성 및 내담즙성 측정

유산균을 5 mL MRS 액체배지에 한 콜로니를 접종하여 30°C에서 24시간 동안 배양한 다음, 이것의 0.1%를 새로운 액체배지에 접종하여 본배양하였다. 본배양된 유산균 5 mL를 1,100×g에서 10분 동안 원심분리 하여 균체를 회수하였다. 여기에 동일한 부피의 0.1 N HCl로 조절된 MRS(pH 2.0) 배지를 넣어 현탁시켜 30°C에서 24시간 동안 배양하여 생균수를 측정하였다. 내담즙성은 내산성과 동일한 방법으로 수행하되, 0.5% oxgall이 들어 있는 MRS 액체배지에 24시간 동안 배양한 후 생존균수를 측정하였다.

유산균의 장내부착능 측정

Caco-2 세포주는 ATCC(ATCC HTB37, American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)로부터 분양받았다. Caco-2는 DMEM-high glucose(supplied with 10% fetal bovine serum, 1% non-essential amino acid, 1% streptomycin/penicillin(10,000 IU/mL), 10 mM HEPES, 1 mM sodium pyruvate, 1 mM L-glutamine, Hyclone, Logan, UT, USA) 배지를 사용하고 이틀에 한 번씩 배지를 바꿔주었으며 15일 동안 배양하여 분화시켰다(13). 장내부착능에 사용

Table 1. Distribution of kimchi lactic acid bacteria by morphology

Kimchi type ¹⁾	Number of LAB	Phenotype			Live bacilli and semi-bacilli on LBS	Sticky materials forming cocci on PES
		Bacilli	Semi-bacilli	Cocci		
MK	129	42	47	40	42.7% ²⁾	77.5% ³⁾
YRK	53	18	27	8	17.8%	62.5%
CK	122	55	33	34	35.2%	61.8%
CRK	44	9	19	16	60.7%	81.2%
Total	348	124	126	98	39.1±15.4%	70.8±8.7%

¹⁾MK was mustard stem/leaf kimchi, YRK was young radish kimchi, CK was cabbage kimchi, and CRK was cubed radish kimchi.

²⁾The rate of live bacilli on LBS against total bacilli by kimchi type.

³⁾The rate of live cocci producing mucus materials on PES against total cocci by kimchi type.

한 passage는 25~45까지였다.

Kimoto 등(14)과 Bogovič 등(15)의 방법을 변형시켜 Caco-2 세포주에 대한 부착능을 측정하였다. 유산균을 30°C에서 24시간 동안 배양한 뒤, 균체를 회수하여 phosphate buffered saline(PBS, pH 7.4)으로 3번 세척하였다. 반면, 15일 배양된 Caco-2 세포를 PBS로 2번 세척한 후, 여기에 유산균이 10⁸ CFU/mL가 되도록 넣고 항생제와 fetal bovine serum이 들어있지 않은 배지를 각 well마다 1 mL씩 넣었다. 이를 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 1시간 동안 배양한 후, 부착하지 못한 유산균을 버리기 위해 PBS로 세 번 세척하였다. 각 well에 메탄올 1 mL씩 넣고 5분 동안 세포가 cover slip에 고정되도록 하고 Gram 염색 후 광학 현미경으로 관찰하였다(×4,000). 또한 생균수 측정을 위해 각 well마다 0.05% triton X-100 1 mL를 넣고 10분 동안 흔들어 주었다. 이를 희석하여 MRS배지에 도말하고 30°C에서 1~2일 동안 배양하였다. 양성 대조구로 *Lactobacillus rhamnosus* GG(ATCC 53103)를 사용하고 음성 대조구로는 *Lactobacillus acidophilus* ATCC4356을 사용하였다(16). 부착율(%)은 Caco-2 세포에 넣은 초기균수에 대한 부착균수의 비율로 하였다.

결과 및 고찰

김치 유산균의 분리 및 생물학적 특성

김치로부터 유산균은 CaCO₃에 대하여 투명환을 형성, Gram 양성, catalase 음성 결과를 보인 균주로 선별하였고 그 결과 갓김치 129종, 열무김치 53종, 배추김치 122종, 깍두기 44종으로 총 348종을 분리하였다(Table 1). 간균과 단간균 : 구균의 비가 배추김치 2.6:1, 열무김치 5.6:1, 깍두기 1.8:1, 갓김치 2.2:1을 나타내 전반적으로 구균이 적었고, 이러한 현상은 특히 열무김치에서 두드러졌다. 그러나 모든 김치 시료에서 구균이 적은 것은 *Leuconostoc* 속이 주를 이루는 구균이 낮은 pH에서 자라지 못하며 수집된 김치가 모두 발효 중간 단계에 해당하는 시기의 것이었기 때문으로 고찰된다(17).

LBS 배지는 *Lactobacilli*의 대사에 필요한 지방산을 공급 해주면서 최종적으로 pH 5.5로 조절해 곰팡이, 효모, streptococci 등의 생육을 저해하여 *Lactobacilli*만 성장할 수 있게

해주며, PES 배지는 20°C에서 glucose로부터 dextran을 생산하여 균 주변에 점질물을 형성하는 것을 이용해 *Leuconostoc* 속을 일차적으로 선별할 수 있어 김치에서 유산균을 분리하는데 많이 이용되고 있다(9,10,18). LBS 및 PES 배지에서의 생육으로 선별된 *Lactobacillus* 속 및 *Leuconostoc* 속은 4종의 김치에서 각각 39.1±15.4%와 70.8±8.7%로 나타났다(Table 1). *Leuconostoc* 속으로 추정되는 구균은 4종의 김치에서 비슷하게 존재했지만 *Lactobacillus* 속으로 추정되는 균은 깍두기에서 60.7%가 선별되어 다른 김치 종류 유래의 유산균들에 비해 선별율이 높았다. 그러나 각 배지에 대해 비선별적 생육을 한 유산균이 종이나 존재하였고 그 중에서도 LBS배지에서 성장하고 동시에 PES배지에서 점질물을 형성한 유산균이 총 8종이 나타났다(data not shown). 이들은 모두 2개의 단세포가 쌍으로 형성된 형태였다. 김치 유산균 중 *Lb. fermentum* KFRI164, *Leuc. cremoris* KFRI241, *Pediococcus* 속, *Weissella* 속이 LBS 및 PES 배지에 대하여 동시에 생육하거나 비선별적 생육을 한다는 보고에 따라 이들과 유사한 종일 것으로 예상된다(18).

유산균의 plasmid는 유당 발효, anti-phage activity, EPS, 향미, 박테리오파지, 구연산 생산 및 항생제 내성 등 산업적으로 유효한 기능성 물질의 생산에 이용되며, 다양한 plasmid pattern을 지니고 있어 향후 김치 유산균의 분류 및 유용 유전자 전달 vector로의 활용 등 다양한 응용 분야에 적용될 수 있다(19). 이런 의미에서 김치 유산균의 plasmid를 분리하여 확인한 결과, 전체 유산균 중 plasmid를 지닌 유산균은 89.8%로 약 10% 정도의 유산균은 plasmid가 없었다(Table 2). 그러나 배추김치 유래 유산균은 81.3%가 plasmid를 지니 다른 김치류와 달리 plasmid가 없는 유산균이 많았다. Plas-

Table 2. Plasmid profiling of kimchi lactic acid bacteria

Kimchi type ¹⁾	Harboring LAB (%)	Number of total plasmid bands per each LAB	Number of plasmid bands beyond 5 kb per each LAB
MK	93.8	3.6±0.7	2.6±1.4
YRK	97.9	4.1±0.5	3.3±1.5
CK	81.3	3.0±0.3	2.2±1.3
CRK	89.7	3.2±0.5	2.4±1.3
Total	89.8	3.5±0.5	2.6±1.4

¹⁾See the legend of Table 1.

mid를 지닌 유산균은 평균 3.5 ± 0.5 의 plasmid band를 지니고 있었으며 이 중 plasmid band를 1개만 갖는 균주는 14.5%였으며 많게는 8~10개의 plasmid band를 지니는 유산균도 있었다(data not shown). 열무김치에서 분리한 유산균의 plasmid band가 평균 4.1 ± 0.5 개로 다른 김치류의 유산균에 비해 많았다.

장관 유래 Lactobacilli의 경우 plasmid가 존재한다는 보고가 아직까지 없는 것과 달리(20), 치즈 중의 *Lactococcus* sp., *Enterococcus* sp., *Lactobacillus* sp.가 모두 plasmid가 존재하였다(21). 또한 유산균의 유래원에 따라 같은 종의 유산균일지라도 plasmid profile에 차이가 나고, 특히 같은 종일지라도 유산균이 plasmid를 지니는 개수가 다를 수 있다고 보고된 바도 있다(22). 이는 유산균이 존재하는 환경에 따라 plasmid 보유에 차이가 생기는 것으로 볼 수 있으며 김치 유산균이 *Lactobacillus* sp.와 *Leuconostoc* sp.가 우점종으로 존재함에도 불구하고(5) 본 연구에 따르면 김치 원료에 따라 유산균이 지니는 plasmid profile이 달라지는 것으로 판단된다.

김치 유산균이 생산하는 exopolysaccharide(EPS) 함량

전체 357종의 유산균 중 9.5%의 유산균이 건물중량으로 5 mg/mL 이상의 EPS 생성능을 보였다(Table 3). 무를 주재료로 한 깍두기에서 11.1%, 열무김치에서 10.9%의 비율로 EPS 생성 유산균이 많았지만 배추김치에서 분리한 유산균의 EPS 생성량이 8.4 ± 2.0 mg/mL를 보여 균주 당 생산되는 EPS 함량이 높았다. 또한 전체 EPS 생산균주 중 배추김치에서 분리한 3종을 제외하고 모두 구균이었다(data not shown).

Ruas-Madiedo 등(23)에 의하면 인체 장내균총, 유제품, 요구르트 등에서 분리된 유산균 중 17% 정도가 EPS를 생산하는 능력을 가졌다고 보고하여 본 연구에서 사용한 김치에서는 동물 유래 유산균보다 EPS 생성능을 지닌 유산균 수가 적었다(23). 그러나 20 mg/mL의 sucrose에 대해 김치 유산균으로부터 생산된 EPS 함량은 7.6 ± 1.6 mg/mL로 기존에 보고된 와인(24) 유제품(25-27), sourdough(28) 등의 식품 유래 유산균보다 높게 나타났다(Table 3). 유산균이 생산하는 EPS는 세포벽의 헤파막을 형성하거나 점질물 형태로 세포

외벽을 둘러싸는 물질로 항생제나 식균작용 등의 다양한 외부 스트레스로부터 보호하는 역할을 하는데, 최근에는 유산균의 EPS가 항암효과, 콜레스테롤 저하능, 면역활성 증진 및 항케양효과 등이 보고되면서 물성개선소재로서의 식품의 질적 향상과 더불어 김치 유산균의 프로바이오틱 가능성을 더 높여줄 것으로 판단된다(29).

김치 유산균의 항균활성

유산균은 유기산, H₂O₂ 등의 과산화물질, 박테리오파지 등의 병원성 균 저해물질을 생산하여 유해한 균을 저해하고 장내균총을 개선하는 것으로 알려져 있다(30). 특히 김치는 발효 시작 단계에서는 원료나 제조과정 중 유입된 *Aeromonas* 속, *Erwinia* 속, *Bacillus* 속 등이 검출되지만, 발효 중반 이후부터 유산균 이외의 균주들이 나타나지 않는다(5). 이는 김치의 낮은 산도뿐만 아니라 유산균이 생산하는 다양한 항균물질에 기인한 것이므로 김치 종류에 따라 항균력을 지닌 유산균의 분포를 확인하였다. 전체 김치 유산균 중 모든 감수성 균주에 대하여 3 mm 이하를 보인 균주는 깍두기에서 47.3%, 열무김치에서 22.6%, 배추김치에서 23.0%, 깍두기에서 11.4%로 총 30.5% 비율로 존재하였다(data not shown). 유제품 및 장관에서 분리된 경우 *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium에 대한 항균활성을 지닌 유산균이 많은 반면(31,32), Jacobsen 등(33)의 발효옥수수나 Ahn 등(34)의 김치 유산균, 본 연구에서 분리한 김치 유산균은 이들 세 감수성 균주에 대한 항균력을 보인 균주가 35~50% 밖에 되지 않았고, 특히 발효옥수수에서 분리된 *Lactobacillus* 속의 절반 이상이 3 mm 이하의 지름을 지닌 저해환을 나타내 본 실험의 김치와 유사한 결과를 나타냈다(33,34).

1종 이상의 감수성 균주에 항균활성을 보인 유산균 중 깍두기 김치는 *Vibrio parahaemolyticus*에 대한 항균 활성을 지닌 유산균이 다른 김치에 비해 많았다(Fig. 1). 그러나 *Bacillus* sp., *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium*에 대해 항균력을 지닌 유산균은 깍두기보다 열무김치, 배추김치, 깍두기에 2배 이상 존재하였다. 특히 김치 유산균의 항균력은 동일 *Bacillus* 속 중에서 *B. cereus*보다 *B. subtilis*에 대해 높은 활성을 나타내는데, 이런 중간 항균력의 차이는 Galeano 등

Table 3. Distribution of exopolysaccharide producing lactic acid bacteria isolated from kimchi and the other sources

Sources	Kimchi type ¹⁾				Total	Wine	Raw milk	Sourdough	Fermented milk	Yogurt
	MK	YRK	CK	CRK						
EPS producing strain number	10 (7.7%) ²⁾	6 (10.9%)	12 (9.4%)	5 (11.1%)	34 (9.5%)	12	6	7	13	18
Additives (mg/mL)			Sucrose 20			Sucrose 100	Sucrose 50	Sucrose 82.8	Lactose 200	Skim milk 100
Produced EPS (mg/mL)	7.4 ± 1.2	6.6 ± 1.2	8.4 ± 2.0	7.5 ± 1.1	7.6 ± 1.6	0.71 ± 0.21	8.18 ± 6.49	3.96 ± 1.71	0.72 ± 0.47	0.06 ± 0.05
Reference			This study			23	24	25	26	27

¹⁾See the legend of Table 1.

²⁾The rate of EPS producing LAB against total LAB by kimchi type.

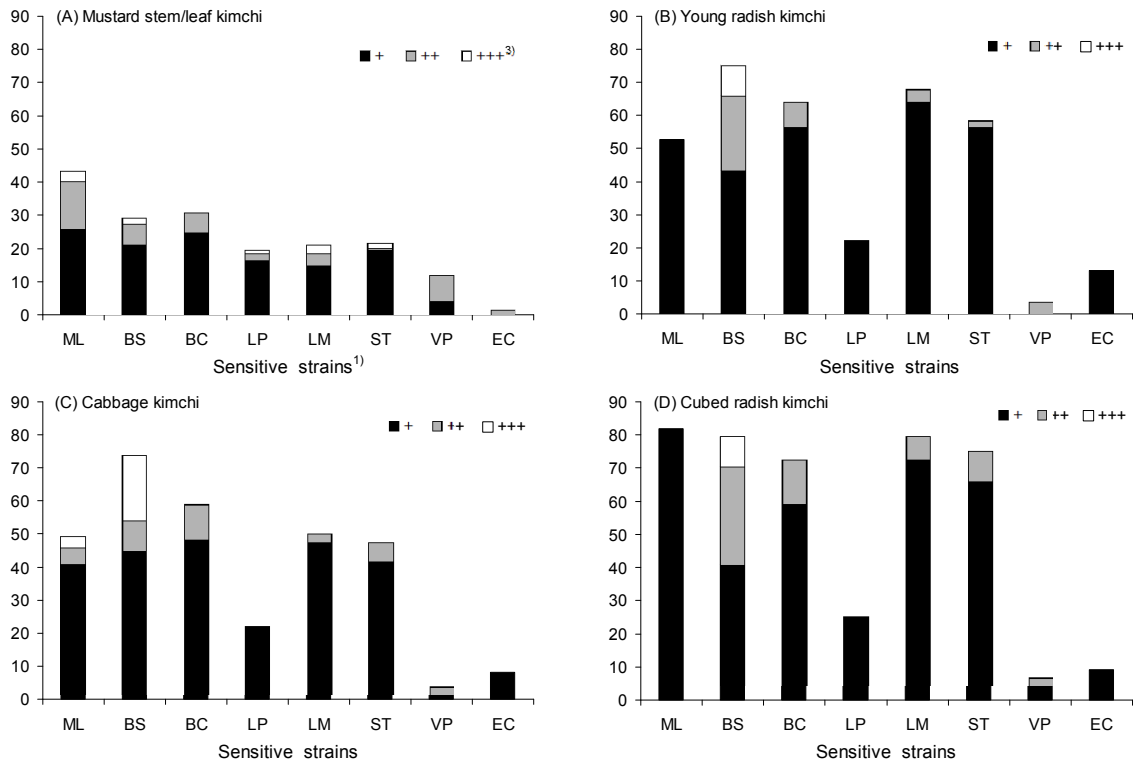


Fig. 1. The rate of antimicrobial lactic acid bacteria isolated from kimchi. ¹⁾ML, *Micrococcus luteus*; BS, *Bacillus subtilis*; BC, *Bacillus cereus*; LP, *Lactobacillus plantarum*; LM, *Listeria monocytogenes*; ST, *Salmonella Typhimurium*; VP, *Vibrio parahaemolyticus*; EC, *Escherichia coli*. ²⁾The rate of lactic acid bacteria showing antimicrobial activities against total lactic acid bacteria by kimchi type. ³⁾The diameter of the clear zone +: 3~6 mm, ++: 6~10 mm, +++: above 10 mm.

(35)이 보고한 바와 같이 감수성 미생물의 종 및 생육 환경 그리고 김치 유산균이 생산하는 H₂O₂와 같은 과산화물의 감수성 차이에 기인한다고 판단된다(30,35). 또한 장내병원성균을 접종해 김치의 발효 기간 동안 이들의 생육 저해도를 살펴본 연구에서는 갓김치가 배추김치보다 유산균의 증가 속도가 느려 발효가 더디게 진행된다고 하였으며, 병원성균 저해는 갓김치의 유산균보다 갓이 지니는 allyl isothiocyanate 영향을 받기 때문이라고 보고한 바 있어 김치의 원재료에 따라 유산균의 생육이 영향을 받아 항균력에 차이가 있는 것으로 판단된다(36).

김치 유산균의 내산성, 내담즙성 및 장내부착능

유산균이 probiotics가 되기 위한 필수조건으로 위장관 상부의 산성 조건 및 소화효소가 많은 담즙이 존재하는 환경에서의 생존이 요구되며, 또한 장내에 부착하여 군락을 형성해

생존하여야 비생존 유산균에 비하여 면역활성 증진 및 항암 효과가 크다고 보고되고 있다(37). 따라서 김치 유산균의 내산성, 내담즙성 및 장내부착능을 확인하였다. 대조구인 *Lactobacillus rhamnosus* GG(LGG)의 내산성 및 내담즙성은 초기 군수에 대하여 각각 0.001와 7.207%를 나타냈고 이보다 높은 저항력을 보인 김치 유산균은 각각 105종과 80종이었다(Table 4). 이 중 내산성과 내담즙성을 동시에 갖는 유산균은 51종에 해당되었다(data not shown). 인체 장관 유래의 lactobacilli 93종 중 97%는 2% bile에서도 생존했지만, 이와 달리 pH 3.0에서 4시간만에 50%의 유산균이 생존하지 못해 내담즙성이 높지만 내산성이 낮은 것으로 확인되었다(38). 또한 기존에 보고된 연구들보다 낮은 pH 2.0 조건에서 김치 유산균 중 30.2%나 생존함에 따라 김치에는 내산성이 높은 유산균이 많았지만 내담즙성을 지닌 유산균은 더 적은 것으로 나타났다(32,39-41). 하지만 김치 종류별로 봤을 때, 열무

Table 4. The number of acid/bile resistant, and Caco-2 adherent lactic acid bacteria isolated from kimchi and the other sources

Sources	Kimchi type ¹⁾				Total
	MK	YRK	CK	CRK	
Acid resistant strains	31 (24.0%) ²⁾³⁾	23 (43.3%)	31 (25.4%)	20 (45.5%)	105 (30.2%)
Bile resistant strains	24 (18.6%)	14 (26.4%)	26 (21.3%)	16 (36.4%)	80 (23.0%)
Adherent strains	24 (18.6%)	5 (9.4%)	11 (9.0%)	2 (4.5%)	42 (12.1%)

¹⁾See the legend of Table 1.

²⁾The number of LAB having higher resistance or adherence than *L. rhamnosus* GG.

³⁾The rate of LAB having higher resistance or adherence than *L. rhamnosus* GG.

김치와 깍두기에서 분리한 유산균 중 내산성을 보인 균주가 43.3~45.5%로 갓김치와 배추김치보다 더 많았고 내담즙성을 지닌 유산균은 깍두기에서 36.4%로 다른 김치에 비해 월등히 많았다. 이러한 결과는 7가지 종류의 이탈리아 치즈에서 분리된 *L. plantarum* strains가 내산성과 내담즙성에 차이가 있는 것과 유사하게 나타났다(42).

전체 348종의 김치 유산균 중 Caco-2 세포에 부착된 균수가 초기 균수에 대해 $1.44 \pm 0.73\%$ 의 부착율을 보인 *L. rhamnosus* GG와 비슷하거나 더 높은 부착율을 보인 유산균은 총 42종이 확인되었다(Table 4). 본 연구에서 분리한 유산균은 열무김치, 배추김치, 깍두기에서 각각 9.4%, 9.0%, 4.5%로 존재한 반면, 갓김치에서 18.6%의 장내부착능을 지닌 유산균이 확인되었다. 기존에 보고된 연구에 따르면, 발효유제품 종균인 *Lactobacillus* sp. 중 27.3%, 인체 장관 유산균 중 6.6%, boza에서 분리된 유산균 중 37.5%가 Caco-2 세포에 대해 부착성을 보여 본 연구에서 분리한 김치 유산균은 인체 장관 유래 유산균보다는 많았으나 발효유제품이나 boza의 유산균보다 적게 나타나 유산균의 유래 환경에 따른 차이는 확인하기 어려웠다(40,41,43). 이는 숙주에 대한 장내부착능이 유산균 균주가 갖는 S layer protein, teichoic acid 등의 표면 물질 때문이라고 추정되고 있어 유산균의 장내부착능은 유래원에 의한 영향을 받지 않았기 때문으로 생각된다(44). 또한 김치는 사용하는 원료에 상관없이 *Lactobacillus* sp.와 *Leuconostoc* sp.가 대부분으로 유산균 종이 한정적으로 함유되어 있음에도 불구하고(5) 본 연구의 결과에서 볼 때, 김치 종류에 따라 내산성 및 내담즙성, 장내부착능을 지닌 유산균 함량에 차이가 있었으며 이는 김치에 존재하는 프로바이오틱 기능성을 지닌 유산균을 선별해내는데 유용할 것이다.

요 약

갓김치, 배추김치, 열무김치, 깍두기로부터 348종의 유산균을 분리하여 각 김치 종류에 따른 유산균의 특징을 확인하였다. 열무김치의 유산균은 다른 3종의 김치에 비해 간균+단간균:구균의 비가 5.6:1로 구균의 함량이 적었다. *Leuconostoc* 속으로 추정되는 구균의 함량은 4종의 김치가 모두 유사하였으나 *Lactobacillus* 속으로 추정되는 간균과 단간균의 함량은 깍두기에서 60.7%로 높게 나타났다. 다른 김치에 비해 배추김치 유래 유산균 중 18.7%가 plasmid가 없었으나 plasmid를 지닌 유산균 중에는 열무김치 유래 유산균에 평균 4.1 ± 0.5 개의 plasmid bands가 나타났다. 세포 외 다당(EPS)을 5 mg/mL 이상 생산하는 유산균은 무를 주재료로 한 깍두기와 열무김치에 각각 11.1%, 10.9%로 갓김치와 배추김치보다 많았지만 배추김치 유래 유산균이 8.4 ± 2.0 mg/mL의 EPS를 생산해 다른 김치 유래 유산균들보다 1 mg 이상 높았다. 갓김치에는 *V. parahaemolyticus*에 대한 항균력을 지닌 유산균이 많은 반면 열무김치, 배추김치, 깍두기

에서 *Bacillus* 속, *L. monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium에 대해 항균력을 지닌 유산균이 갓김치보다 2배 이상으로 나타났다. 열무김치와 깍두기 유래 유산균 중 43.3%, 45.5%가 내산성을 지녔으며, 특히 깍두기의 유산균 중 36.3%가 내담즙성을 나타내 다른 김치보다 많았다. Caco-2 세포에 대한 장내부착능을 지닌 유산균은 18.6%의 비율로 갓김치에 가장 많았다. 이러한 결과에서 볼 때, 김치에 함유된 유산균은 종이 한정적임에도 불구하고 김치 종류에 따라 각 김치에 함유된 유산균의 생물학적 특징에 차이가 있었으며, 특히 내산성, 내담즙성, 장내부착능을 지닌 유산균이 김치에 따라 차이가 나타남으로써 본 연구의 결과가 프로바이오틱 기능성을 지닌 유산균을 선별하는데 유용한 자료가 될 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구는 농림수산식품부 연구개발사업 310014-03-1-CG000에 의해 이루어진 것임.

문 헌

1. Sybesma W, Hugenholtz J, de Vos WM, Smid EJ. 2006. Safe use of genetically modified lactic acid bacteria in food, bridging the gap between consumers, green groups, and industry. *Electron J Biotechnol* 9: 424-448.
2. Lee CH, Ahn BS. 1995. Literature review on Kimchi, Korean fermented vegetable foods. I. History of Kimchi making. *Korean J Dietary Culture* 10: 311-319.
3. Lee H, Yoon H, Ji Y, Kim H, Park H, Lee J, Shin H, Holzapfel W. 2011. Functional properties of *Lactobacillus* strains isolated from kimchi. *Int J Food Microbiol* 145: 155-161.
4. Jo JS, Hwang SY. 1988. Standardization of Kimchi and related products (2). *Korean J Dietary Culture* 3: 301-307.
5. Han HU, Lim CR, Park HK. 1990. Determination of microbial community as an indicator of Kimchi fermentation. *Korean J Food Sci Technol* 22: 26-32.
6. Kim M, Chun J. 2005. Bacterial community structure in kimchi, a Korean fermented vegetable food, as revealed by 16S rRNA gene analysis. *Int J Food Microbiol* 103: 91-96.
7. Lee JS, Heo GY, Lee JW, Oh YJ, Park JA, Park YH, Pyun YR, Ahn JS. 2005. Analysis of kimchi microflora using denaturing gradient gel electrophoresis. *Int J Food Microbiol* 102: 143-150.
8. Lee MK, Rhee KK, Kim JK, Kim SM, Jeong JW, Jang DJ. 2007. A survey of research papers on Korean Kimchi and R&D trends. *Korean J Food Culture* 22: 104-114.
9. Lee JS, Chun CO, Hector M, Kim SB, Kim HJ, Park BK, Joo YJ, Lee HJ, Park CS, Ahn JS, Park YH, Mheen TI. 1997. Identification of *Leuconostoc* strains isolated from Kimchi using carbon-source utilization patterns. *J Microbiol* 35: 10-14.
10. Rogosa M, Mitchell JA, Wiseman RF. 1951. A selective medium for the isolation and enumeration of oral and fecal lactobacilli. *J Bacteriol* 62: 132-133.
11. Smitinont T, Tansakul C, Tanasupawat S, Keeratipibul S, Navarini L, Bosco M, Cescutti P. 1999. Exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria strains from traditional Thai fermented foods: isolation, identification, and exopolysac-

- charide characterization. *Int J Food Microbiol* 51: 105-111.
12. Mayr-Harting A, Hedges AJ, Berkeley RCW. 1972. Methods for studying bacteriocins. In *Methods in Microbiology*. Bergen DW, Norris JR, eds. Academic Press, New York, NY, USA. p 315-422.
 13. Pinto M, Robine-Leon S, Apay M, Keding M, Triadou N, Dussaulx E, Lacroix B, Simon-Assmann P, Haffen K, Fogh J, Zwielenbaum A. 1983. Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biol Cell* 47: 323-330.
 14. Kimoto J, Kurisaki J, Tsuji NM, Ohmomo S, Okamoto T. 1999. *Lactococci* as probiotic strains: adhesion to human enterocyte-like Caco-2 cells and tolerance to low pH and bile. *Lett Appl Microbiol* 29: 313-316.
 15. Bogovič MB, Naat M, Zorič M. 2003. Adhesion of two *Lactobacillus gasseri* probiotic strains on Caco-2 cells. *Food Technol Biotechnol* 41: 83-88.
 16. Blum S, Reniero R, Schiffrin EJ, Crittenden R, Mattila-Sandholm T, Ouwehand AC, Salminen S, von Wright A, Saarela M, Saxelin M, Collins K, Morelli L. 1999. Adhesion studies for probiotics: need for validation and refinement. *Trends Food Sci Technol* 10: 405-410.
 17. Choi IK, Jung SH, Kim BJ, Park AY, Kim J, Han HU. 2003. Novel *Leuconostoc citreum* starter culture system for the fermentation of kimchi, a fermented cabbage product. *Antonie Van Leeuwenhoek* 84: 247-253.
 18. Lee MK, Park WS, Kang KH. 1996. Selective media for isolation and enumeration of lactic acid bacteria from kimchi. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 25: 754-768.
 19. Soomro AH, Masud T. 2007. Protein pattern and plasmid profile of lactic acid bacteria isolated from dahi, a traditional fermented milk product of Pakistan. *Food Technol Biotechnol* 45: 447-453.
 20. Yoon SS, Kim C. 2001. Development of host-vector systems for lactic acid bacteria. *Korean J Appl Microbiol Biotechnol* 29: 1-11.
 21. Veljovic K, Terzic-Vidojevic A, Vukasinovic M, Strahinic I, Begovic J, Lozo J, Ostojic M, Topisirovic L. 2007. Preliminary characterization of lactic acid bacteria isolated from Zlata cheese. *J Appl Microbiol* 103: 2142-2152.
 22. Ricci G, Borgo F, Fortina MG. 2006. Plasmids from *Lactobacillus helveticus*: distribution and diversity among natural isolates. *Lett Appl Microbiol* 42: 245-258.
 23. Ruas-Madiedo P, Moreno JA, Salazar N, Delgado S, Mayo B, Margolles A, de los Reyes-Gavilan CG. 2007. Screening of exopolysaccharide producing *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains isolated from the human intestinal microbiota. *Appl Environ Microbiol* 73: 4385-4388.
 24. Montersino S, Prieto A, Muñoz R, de Las Rivas B. 2008. Evaluation of exopolysaccharide production by *Leuconostoc mesenteroides* strains isolated from wine. *J Food Sci* 73: M196-M199.
 25. Van der Meulen R, Grosu-Tudor S, Mozzi F, Vaningelgem F, Zamfir M, de Valdez GF, De Vuyst L. 2007. Screening of lactic acid bacteria isolates from dairy and cereal products for exopolysaccharide production and genes involved. *Int J Food Microbiol* 118: 250-258.
 26. Bauer R, Bekker JP, Wyk Nv, du Toit C, Dicks LM, Kossmann J. 2009. Exopolysaccharide production by lactose-hydrolyzing bacteria isolated from traditionally fermented milk. *Int J Food Microbiol* 131: 260-264.
 27. Mozzi F, Vaningelgem F, Hébert EM, Van der Meulen R, Moreno MRF, Font de Valdez G, De Vuyst L. 2006. Diversity of heteropolysaccharide producing lactic acid bacterium strains and their biopolymers. *Appl Environ Microbiol* 72: 4431-4435.
 28. Galle S, Schwab C, Arendt E, Gänzle M. 2010. Exopolysaccharide-forming *Weissella* strains as starter cultures for sorghum and wheat sourdoughs. *J Agric Food Chem* 58: 5834-5841.
 29. Patricia RM, Hugenholtz J, Zoon P. 2002. An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Int Dairy J* 12: 163-171.
 30. Kaur IP, Chopra K, Saini A. 2002. Probiotics: potential pharmaceutical applications. *Eur J Pharm Sci* 15: 1-9.
 31. Galvez A, Abriouel H, López RL, Ben Omar N. 2007. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int J Food Microbiol* 120: 51-70.
 32. Guo XH, Kim JM, Nam HM, Park SY, Kim JM. 2010. Screening lactic acid bacteria from swine origins for multi-strain probiotics based on in vitro functional properties. *Anaerobe* 16: 321-326.
 33. Jacobsen CN, Nielsen VR, Hayford AE, Møller PL, Michaelsen KF, Pærregaard A, Sandstrom B, Tvede M, Jakobsen M. 1999. Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. by *in vitro* techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in human. *Appl Environ Microbiol* 65: 4949-4956.
 34. Ahn DK, Han TW, Shin HY, Jin IN, Ghim SY. 2003. Diversity and antibacterial activity of lactic acid bacteria isolated from kimchi. *Korean J Microbiol Biotechnol* 31: 191-196.
 35. Galeano B, Korff E, Nicholson WL. 2003. Inactivation of vegetative cells, but not spores, of *Bacillus anthracis*, *B. cereus*, and *B. subtilis* on stainless steel surfaces coated with an antimicrobial silver- and zinc-containing zeolite formulation. *Appl Environ Microbiol* 69: 4329-4331.
 36. Kang CH, Chung KO, Ha DM. 2002. Inhibitory effect on the growth of intestinal pathogenic bacteria by kimchi fermentation. *Korean J Food Sci Technol* 34: 480-486.
 37. Ouwehand AC, Kirjavainen PV, Shortt C, Salminen S. 1999. Probiotics: mechanisms and established effects. *Int Dairy J* 9: 43-52.
 38. Köll P, Mändar R, Smidt I, Hütt P, Truusalu K, Mikelsaar RH, Shechetova J, Krogh-Andersen K, Marcotte H, Hammarström L, Mikelsaar M. 2010. Screening and evaluation of human intestinal lactobacilli for the development of novel gastrointestinal probiotics. *Curr Microbiol* 61: 560-566.
 39. Nur YZ, Aslim B. 2010. Assessment of potential probiotic and starter properties of *Pediococcus* spp. isolated from Turkish-type fermented sausages (sucuk). *J Microbiol Biotechnol* 20: 161-168.
 40. Delgado S, O'Sullivan E, Fitzgerald G, Mayo B. 2007. Subtractive screening for probiotic properties of *Lactobacillus* species from the human gastrointestinal tract in the search for new probiotics. *J Food Sci* 72: M310-M315.
 41. Todorov SD, Botes M, Guigas C, Schillinger U, Wiid I, Wachsman MB, Holzapfel WH. 2007. Boza, a natural source of probiotic lactic acid bacteria. *J Appl Microbiol* 104: 465-477.
 42. Zago M, Fornasari ME, Carminati D, Burns P, Suárez V, Vinderola G, Reinheimer J, Giraffa G. 2011. Characterization and probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from cheeses. *Food Microbiol* 28: 1033-1040.
 43. Tuomola EM, Salminen SJ. 1998. Adhesion of some probiotic and dairy *Lactobacillus* strains to Caco-2 cell cultures. *Int J Food Microbiol* 41: 45-51.
 44. Buck BL, Altermann E, Svingerud T, Kaenhammer TR. 2005. Functional analysis of putative adhesion factors in *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Appl Environ Microbiol* 71: 8344-8351.

(2012년 9월 14일 접수; 2012년 12월 27일 채택)